

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

549676

(43) 国際公開日  
2004 年 9 月 30 日 (30.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/083869 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 33/92
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/003873
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 22 日 (22.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-077382 2003 年 3 月 20 日 (20.03.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP). ザ・ハート・リサーチ・イン

スティチュート・リミテッド (THE HEART RESEARCH INSTITUTE LTD.) [AU/AU]; 2050 ニュー・サウス・ウェールズ州キャンパードウン、ミッセンデン・ロード 145-147 Wales (AU).

(72) 発明者; および

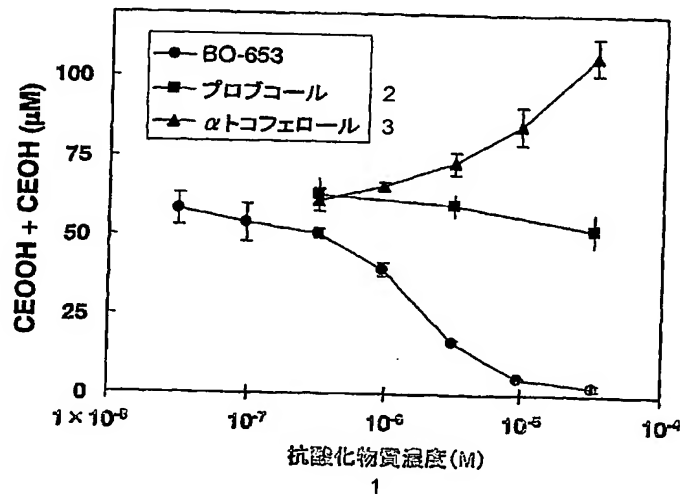
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 進士 修 (CYNSHI, Osamu) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 135 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). ストッカー ローランド (STOCKER, Roland) [AU/AU]; 2230 ニュー・サウス・ウェールズ州クロヌラ、ワイアンバー・ロード 13/57 Wales (AU).

(74) 代理人: 社本 一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR EVALUATING ANTIOXIDATION CAPABILITY OF ORGANISM SAMPLE

(54) 発明の名称: 生体試料の抗酸化能力を評価する方法



1...ANTIOXIDANT MATERIAL  
CONCENTRATION (M)  
2...PROBUCOL  
3...α-TOCOPHEROL

(57) Abstract: A method for evaluating the antioxidation capability of an organism sample, which comprises: (a) a step of taking out a sample containing at least a substrate to be oxidized from the organism, (b) a step of starting the oxidation of the substrate, (c) a step of continuing the above oxidation, and (d) a step of determining an oxidation product from the substrate to be oxidized, by measuring the rate of oxidation during the course of the above oxidation or by a measurement after the stop of the oxidation, wherein the steps (b) and (c) are carried out in the presence of one or more antioxidation components.

(57) 要約: 生体試料の抗酸化能力を評価する方法であって: (a) 少なくとも被酸化性基質を含有する試料を生体から取り出す段階; (b) 前記被酸化性基質の酸化反応を開始させる段階; (c) 前記酸化反応を継続する段階; および

[続葉有]



(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(d) 前記酸化反応の進行中にその速度を測定することにより、または前記酸化反応を停止させた後の測定により、前記被酸化性基質からの酸化生成物を定量する段階を含んでなり、前記段階 (b) および (c) が 1 種またはそれを越える抗酸化成分の存在下で行われる方法が提供される。

## 明 細 書

## 生体試料の抗酸化能力を評価する方法

## 5 技術分野

本発明は、生体内における酸化ストレスに対する抗酸化能力の評価方法に関する。

## 背景技術

ヒトを含む好気性生物は、酸素による酸化的リン酸化によってエネルギーを得  
10 ている。この酸化的リン酸化は、酸素から生じる酸素ラジカルを介して進行する。  
したがって、酸素ラジカルの存在は、生体にとって必須である。

しかし、酸素ラジカルは、生体内の組織または生体成分を酸化するという酸化  
ストレスにもなると考えられ、その酸化ストレスが、白内障、糖尿病、アルツハ  
イマー、癌、動脈硬化、心肺疾患、高コレステロール血症、慢性炎症性疾患、虚  
15 血性疾患のような種々の疾患の増悪因子になることが知られている (Sies H.  
(1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Review. Exp. Physiol. 82: 291-5 ;  
Scott G. (1997) Antioxidants in science, technology, medicine and nutrition. Coll House,  
UK Publishing ; Porter N. A. (1990) Auto-oxidation of polyunsaturated fatty acids:  
Initiation, propagation and product distribution (basic chemistry). Vigo-Pelfrey, C. ed  
20 Membrane lipid oxidation. Vol. 1 Boca Raton, FL, CRC Press ; Simic M., Karel M.  
(1980) Auto oxidation in food and biological systems. New York, Plenum Press) 。酸  
素ラジカルを介する生体内でのエネルギー生産は常に行われているから、生体は  
常に酸素ラジカルによる酸化ストレスに曝されていることになる。

生体は、この酸化ストレスから個体を護るための防御手段として抗酸化能力を  
25 有している。この抗酸化能力のレベルには個体差があるため、かなりの酸化スト  
レスに曝されても上記のような疾患を患わない個体もあれば、容易に患う個体も  
ある。

したがって、酸化ストレスによって増悪する上記のような疾患に対する個体の抗酸化能力を正確に評価できれば、そうした疾患を予防または治療するうえで有用な情報を得ることができる。

5 これまで、抗酸化能力の評価方法として、生体内で既に酸化された酸化生成物を測定する方法と、まだ酸化されていない生体試料を取り出して *ex vivo* で酸化を惹起して、試料の酸化され難さを調べる方法とが知られている。

生体内で既に酸化された酸化生成物を測定する方法については、酸化生成物として T B A 反応性物質である過酸化脂質を測定する方法が古くから用いられている (Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem*  
10 *Med.* 1976 15:212-6.)。この方法は、過酸化脂質を T B A とともに酸性条件下で加熱し生成する蛍光強度を測定することによって、生体内で生成した過酸化脂質を測定する方法である。しかしながら、この方法では、過酸化脂質が生体内のどこで生成したか、およびどのような反応によって生成したかについての情報が得られないため、その測定値が、生体内のどの組織におけるどのような酸化反応に  
15 対する抗酸化能力を反映したものであるかを知ることができない。さらに、過酸化脂質は、生体内の酵素反応によっても生成することに加えて、その濃度は代謝や排泄による影響が避けられないので、生体内で既に酸化された酸化生成物を測定する方法は、生体の抗酸化能力の評価法としては不十分である。

近年開発された酸化生成物の測定法であるイソプロステイン F 2  $\alpha$  を測定する  
20 方法によれば、生体内の酸化反応のうち酵素反応による酸化反応の影響を避けることができるので、ラジカル反応による酸化生成物のみを測定でき、したがって、そうした酸化反応に対する抗酸化能力のみを評価できることが報告されている

(Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 17:2309-15)。しかし、  
25 生体内のどの組織のどのようなラジカル酸化反応に対する抗酸化能力であるかを知ることができず、しかも依然として酸化生成物の代謝や排泄による影響が避けられない。

一方、*ex vivo* で生体試料の酸化を惹起する方法では、生体から試料を取り出し、そしてその試料を体外で酸化反応に付することにより、その試料中に含まれ

る生体内抗酸化成分の抗酸化能力を評価することで、その生体試料が取り出された特定の組織における抗酸化能力を評価することができる。

この方法では、例えば、血清もしくは組織ホモジネート試料などを用いる T A S 法 (Total Antioxidant Status 法 ; Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in  
5 plasma and body fluids. Methods Enzymol. 1994 234:279-93.) が臨床検査法として使用されている。この T A S 法では、酸化剤として過酸化水素とメトミオグロビン (metmyoglobin) とを用いて、鉄イオンを介したラジカル反応による酸化反応を惹起し、この酸化反応に抗する試料の能力を測定することで、試料の抗酸化能力を評価するものである。この方法は、反応時間が典型的には 6 分と短時間であるため、自動分析機でも測定可能である。過酸化水素とメトミオグロビンによる酸化  
10 の代わりに、定常的にラジカルを発生することができる 2,2'-アゾビス (2-アミジノプロパン) ヒドロクロリド (AAPH) による酸化反応を利用した方法として、T R A P 法 (Total Radical-trapping Antioxidant Potential) も開発されている (Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the  
15 total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. FEBS Lett. 1985 187:33-7) 。これら方法では、短時間に多量に発生したラジカルがサンプル中に存在する抗酸化物質を消費することから、酸化開始のために発生させたラジカルと抗酸化物質との直接の反応が起こっていると考えられる。したがって、ラ  
20 ジカルと酸化反応可能な抗酸化成分の総量を抗酸化能力と見做して評価している。

このように、ex vivo で生体試料の酸化を惹起する方法では、ラジカルとの反応が可能なそのサンプル中の特定の抗酸化能を評価することができる。

L D L 試料を用いる方法もあり、Esterbauer により提唱された Esterbauer 法が使用されている (Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous  
25 monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. Free Radic Res Commun. 1989 6:67-75) 。この Esterbauer 法では、L D L 試料に ex vivo で銅イオンを添加して 37℃で保温することで脂質過酸化の連鎖反応を起こし、この脂質過酸化反応に対するその L D L 試料の抗酸化能力を評価している。この測定においては、酸化物の生成を 234 nm における吸光度により評価しており、反応開

始後 234 nm の吸光度変化が検出され始めるまでのラグタイムが、試料中の抗酸化成分の量を反映していると考えられている。この測定において、 $\alpha$ -トコフェロールの投与がヒトにおけるラグタイムの延長を引き起こすことが報告されている (Dieber-Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, Striegl G, Esterbauer H. Effect of oral supplementation with D-alpha-tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoproteins and resistance to oxidation. J Lipid Res. 1991 32:1325-32)。

上記の T A S 法、T R A P 法、Esterbauer 法のいずれの評価方法も、ex vivo で試料中に含まれる抗酸化成分が消失するまで酸化反応を行うものであり、抗酸化成分の総量をもって抗酸化能力と見做している。これら評価方法において用いられる試料中の主要な抗酸化成分は、ビタミン E の中でもっとも抗酸化活性の高い分子種である  $\alpha$ -トコフェロールと考えられる (二木鋭雄、島崎弘幸、美濃真編、抗酸化成分 フリーラジカルと生体防御、1994 学会出版センター)。したがって、これら評価方法においては、主に  $\alpha$ -トコフェロールの総量を抗酸化能力として評価していることになるから、個体からの試料中の  $\alpha$ -トコフェロール含量が高ければその個体の抗酸化能力は高いものと、すなわち、その個体は、酸化ストレスによって増悪される動脈硬化や虚血性疾患のような疾患を患い難いと評価されてきた。事実、これら方法を行うためのキットが、Randox Laboratories Ltd., OXIS International, Inc. 等により、臨床診断に有用なものとして市販されている。

しかしながら、生体内で酸化が進行した動脈硬化病変においても、 $\alpha$ -トコフェロールが消失せずにその病変中に存在することが報告されている (Upston JM, Terentis AC, Morris K, Keaney Jr JF, Stocker R. Oxidized lipid accumulates in the presence of alpha-tocopherol in atherosclerosis. Biochem J. 2002 1;363:753-60)。このことは、動脈硬化病変のような酸化ストレスによって増悪する病変において、 $\alpha$ -トコフェロールに代表される生体内抗酸化成分が存在する状態でも酸化が進行すること、すなわち、そのような生体内抗酸化成分でも阻止できない酸化が起きていることを示唆している。

これに関して、近年、 $\alpha$ -トコフェロールが特定の実験条件では脂質過酸化を促進することが報告されている (Maiorino M, Zamburlini A, Roveri A, Ursini F. Prooxidant role of vitamin E in copper induced lipid peroxidation. FEBS Lett. 1993

330:174-6.)。また、 $\alpha$ -トコフェロールによる脂質過酸化促進作用を測定する方法も報告されている (Witting PK, Mohr D, Stocker R. Assessment of prooxidant activity of vitamin E in human low-density lipoprotein and plasma. *Methods Enzymol.* 1999;299:362-75)。この現象は、 $\alpha$ -トコフェロールに特有の脂質過酸化の促進作用として捉えられており (Upston JM, Terentis AC, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J.* 1999 13:977-94)、それが、抗酸化成分が存在している状態でも酸化が進行する原因の一つとして捉えられている。

こうしたことから、従来の抗酸化能力の評価方法では、酸化ストレスによって増悪する病変の真のリスク評価ができていなかったと考えられる。Karmansky らは、評価された抗酸化能力の程度と病態の程度とが必ずしも良好な相関を示さなかったことを報告している (Karmansky I, Shnaider H, Palant A, Gruener N. Plasma lipid oxidation and susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in male patients with stable coronary artery disease. *Clin Biochem.* 1996 29:573-9)。

したがって、生体内抗酸化成分が存在する状態でも進行する酸化反応による生成物を定量できれば、酸化ストレスによって増悪する病変のリスク評価をより正確に行うことができる。

生体試料の酸化反応による生成物の同定については、LDL酸化の段階を定めるために、コレステロールエステルの酸化生成物であるコレステロールエステルヒドロペルオキシド (CEOOH) とコレステロールエステルヒドロキシド (CEOH) をHPLCで分離する方法が確立されている (L. Kritharides, W. Jessup, J. Gifford, and R. T. Dean, A method for defining the stages of low-density lipoprotein oxidation by the separation of cholesterol- and cholesterol ester-oxidation products using HPLC. *Analytical Biochemistry* 213, 79-89 (1993))。

## 発明の開示

本発明は、抗酸化成分が存在する状態で起こる酸化に対する生体の抗酸化能力を評価する方法を提供する。

本発明者らは、抗酸化成分が存在する状態でも進行する酸化反応の存在に着目して研究を重ねた結果、そのような酸化生成物を測定する方法を見出した。

本発明は、生体試料の抗酸化能力を評価する方法であって：

- (a) 少なくとも被酸化性基質を含有する試料を生体から取り出す段階；
- 5 (b) 前記被酸化性基質の酸化反応を開始させる段階；
- (c) 前記酸化反応を継続する段階；および
- (d) 前記酸化反応の進行中にその速度を測定することにより、または前記酸化反応を停止させた後の測定により、前記被酸化性基質からの酸化生成物を定量する段階
- 10 を含んでなり、前記段階（b）および（c）が1種またはそれを越える抗酸化成分の存在下で行われる方法の発明である。

また、本発明は、この方法により評価された生体試料の抗酸化能力に基づいて、対象患者の疾患の診断または病態の予後評価および／または進展予測を行う方法の発明でもある。

- 15 さらに、本発明は、抗酸化性被検成分の抗酸化能力を評価する方法であって：- (a) 少なくとも被酸化性基質を含有する試料を生体から取り出す段階；
- (b) 前記生体試料に前記抗酸化性被検成分を添加する段階；
- (c) 段階（b）の混合物の酸化反応を開始させる段階；
- (d) 前記酸化反応を継続する段階；および
- 20 (e) 前記酸化反応の進行中にその速度を測定することにより、または前記酸化反応を停止させた後の測定により、前記被酸化性基質からの酸化生成物を定量する段階
- を含んでなり、前記段階（c）および（d）が1種またはそれを越える抗酸化成分の存在下で行われる方法の発明である。

25

#### 図面の簡単な説明

図1は、実施例1において酸化反応を停止させた後の処理液の代表的なHPLCチャートを示す。約9分の保持時間のピークがCEOOHとCEOHであり、約5分の保持時間のピークが $\alpha$ -トコフェロールである。



図2は、AAPH濃度と酸化生成物との関係を示したグラフを示す。横軸はAAPH濃度であり、縦軸はコレステロールエステルヒドロペルオキシド（ $\text{CEOOH}$ ）とコレステロールエステルヒドロキシド（ $\text{CEOH}$ ）の生成量の和である。

図3は、実施例2において $\alpha$ -トコフェロールが消失した酸化反応液の代表的なHPLCチャートを示す。

図4は、種々の濃度の $\alpha$ -トコフェロール、プロブコールまたはBO-653存在下での $\text{CEOOH}$ と $\text{CEOH}$ の生成量の推移を示したグラフを示す。

#### 発明の詳細な説明

10 本発明の1つの側面は、抗酸化成分と被酸化性基質とを含有する生体試料に *ex vivo* で酸化反応を開始させ、その抗酸化成分が酸化種によって消費し尽くされない状態でその酸化反応を継続させ、そしてこの酸化反応により酸化された被酸化性基質を定量することを含んでなる、生体試料の抗酸化能力を評価する方法である。この方法では、生体試料、引いては、その生体試料が取り出された個体の抗酸化能力が評価されることになる。

この方法において対象となる生体は、哺乳動物、好ましくはヒトである。生体試料には、組織ホモジネート、リンパ液、尿、血液、血漿および血清が含まれる。試料が取り出される組織は、特に制限されず、皮膚、肝臓、血管壁、血液、尿が含まれ、好ましくは血液である。本発明の方法に使用される試料は、生体内におけるそのままの濃度で、またはそれを10000倍まで、好ましくは10倍までに希釈して使用される。希釈は、生理食塩水で行うのが好ましい。場合により、試料の酸化を防ぐために、キレーターを加えてもよい。一般に、3～10のpHに調節するのが好ましい。

25 本発明の方法において生体試料中に生来的に含有される“抗酸化成分”は、生体が酸化ストレスに抗するために有している易酸化性物質の総称であって、特に $\alpha$ -トコフェロールを挙げることができる。この抗酸化成分は、試料中に共存する被酸化性基質よりも先に酸化されることにより系内の酸化種を相殺し、それによって、その被酸化性基質が酸化されるのを阻止する働きを行うものと考えられてきた。しかし、上述のように、 $\alpha$ -トコフェロールが特定の実験条件では脂質

過酸化を促進することが報告されているので、必ずしも被酸化性基質が酸化されるのを阻止するとは限らないと考えられる。

本発明の方法において用いられる“被酸化性基質”という用語は、例えば、試料が血液、血漿または血清である場合には、コレステロールエステル、中性脂質、リン脂質などの脂質；ヘモグロビン、SH基を有する蛋白などを意味し、コレステロールエステルが主要な被酸化性基質である。

本発明の方法における酸化反応は、酸化開始剤を加えることにより、紫外線もしくは放射線のような照射を行うことにより、または自働酸化により開始させることができる。しかしながら、酸化開始剤の使用は、その種類や添加量の増減により酸化反応の強さを調節するのが容易なことから、好ましい開始方法である。用いられる酸化開始剤には、例えば、過酸化水素およびt-ブチルヒドロペルオキシドのような過氧化物；塩化鉄および硫酸銅のような金属塩；2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ヒドロクロリド(AAPH)、2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)および2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジメチルバレロニトリル)のようなアゾ系開始剤；銅、鉄およびヘミンのような遷移金属；ならびに次亜塩素酸、ヘム鉄およびヘモグロビンなどが含まれる。また、酸化開始剤として酵素を用いてもよく、それらには、例えば、リポキシダーゼ、シクロオキシゲナーゼおよびラクトペルオキシダーゼなどが含まれる。

これら酸化開始剤は、単独でも二種以上を組み合わせてもよい。適切な強さの酸化反応に調節できる点でAAPHを単独で使用するのが好ましい。

本発明の具体的な態様においては、酸化開始剤にAAPHを用い、生体試料が血漿のときに、AAPH濃度が5～30mM、好ましくは5～20mM、より好ましくは8～12mM、最も好ましくは10mMである。照射により酸化反応を開始させるには、紫外線または放射線を用いるのが好ましい。自働酸化は、試料を空気中もしくは酸素中に曝すことにより開始することができる。酸化を開始させる温度は一般に20～50℃であり、好ましくは37℃である。

本発明の方法において用いられる“1種またはそれを越える抗酸化成分の存在下”という用語は、抗酸化成分が酸化種との酸化還元反応によって消費され尽くされていない状態を意味する。そのような状態を維持することで、従来から被酸

化性基質の酸化を阻止すると考えられてきた抗酸化成分によっても阻止できない酸化またはそれにより促進される酸化が進行する状況をつくり上げたのである。

- 場合により、生体試料に抗酸化物質を添加することにより抗酸化成分の存在下の状態を人工的に創り出してもよい。この際、添加する抗酸化物質は、生体試料中に生来的に含有される抗酸化成分と同一であっても異なってもよいが、生体試料中に生来的に含有される抗酸化成分と同一物質であるかまたは生体試料に含有される抗酸化成分のうちの1種であることが好ましく、生体試料に含有される抗酸化成分のうちの1種であることがより好ましい。生体試料中に生来的に含有される抗酸化成分と異なる抗酸化物質には、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）のような脂溶性抗酸化化合物およびトロロックスのような水溶性抗酸化化合物が含まれる。

- 開始後に継続される酸化反応の種類はその開始手段に依存する。一般に、酸化開始剤や照射により酸化を開始する場合にはラジカル酸化反応となる。酸化反応の具体的な条件は、被酸化性基質の酸化が進行し、かつ酸化反応が停止するまで抗酸化成分が存在している条件であればよい。しかしながら、具体的な酸化反応の条件は、試料濃度、酸化開始剤濃度、温度および時間などの条件を様々に変えることにより設定することができる。温度は、20～50℃であり、好ましくは37℃である。一般に酸化反応の開始時と同じ温度で行われる。開始後に酸化反応を継続する時間は2～10時間が好ましく、4～8時間がより好ましい。

- 本発明の具体的な態様においては、生体試料が血漿であり、酸化開始剤がAAPHであってその濃度が5～30mM、好ましくは5～20mM、より好ましくは8～12mM、最も好ましくは10mMであり、反応温度が20～50℃、好ましくは37℃であり、そして反応時間が24時間以内、好ましくは8時間以内である。

- 被酸化性基質の酸化生成物は、酸化反応の速度を測定することによっても、酸化反応が停止した後に酸化反応液中の成分の量を測定することによっても行うことができる。

酸化反応速度の測定法には、酸化により被酸化性基質が減少する割合を測定する方法、マーカー物質を添加してその変動により酸化の進行をモニターする方法、

被酸化性基質の酸化により生じる酸化生成物が増加する割合を測定する方法などが含まれ、酸化により減少する被酸化性基質を測定する具体的な方法としては、例えば、酸素消費量の測定、不飽和脂質の減少の測定、グルタチオンの減少の測定などがあげられる。また、マーカ物質を添加してその変動により酸化の進行をモニターする具体的な方法としては、例えば、スピンとラップ剤をマーカ物質として用いる方法、蛍光物質をマーカ物質として用いる方法などがあげられる。被酸化性基質の酸化により生じる酸化生成物が増加する割合を測定する方法は、以下に記載する酸化反応停止後の酸化反応液中の酸化された被酸化性基質の定量と同様である。

- 5 酸化反応停止後の酸化反応液中の成分の測定による場合、酸化された被酸化性基質を定量しても、酸化された被酸化性基質の濃度と酸化されていない基質の濃度とを測定しその比率から酸化率を決定してもよい。いずれの場合も、酸化反応の停止もしくは減弱は、通常は酸化反応液を含む容器を氷水中に浸けることによる急冷、強力な抗酸化剤を添加することによる酸化阻止などによって行われる。
- 10 次いで、その酸化反応液から酸化された被酸化性基質および／または酸化されていない被酸化性基質を分離する。分離は、抽出、電気泳動、カラムクロマトグラフィーなどの方法により行われる。有機溶媒による抽出が好ましい。この目的に適する有機溶媒には、*n*-ヘキサン、クロロホルム、メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸、水およびそれらの混合溶液が含まれる。酢酸を含むメタノール／*n*-ヘキサン混合溶液が好ましい。抽出に使用する有機溶媒の量は、生体試料またはその希釈液の0.1～1000倍、好ましくは1～100倍である。抗体を用いて定量する場合などのように定量の特異性が高い場合には、分離を省略することができる。

- 25 酸化の進行をモニターする為に添加するマーカ物質、および酸化されまたは酸化されていない被酸化性基質の定量を行う手段は、被酸化性基質がいかなる物質であるかに依存する。分析対象物質がコレステロールエステル、中性脂質およびリン脂質などの脂質またはそれらの酸化生成物である場合は、一般的な酸化脂質の測定法やTBA反応性物質の測定法を用いることができ、ヘモグロビンなどの蛋白またはそれらの酸化生成物である場合は、一般的な蛋白の測定法または酸

化変性蛋白の測定法を用いることができる。また、HPLC法、LC-EDC法、TLC法、質量分析法、ELISA法、および発色による吸光度変化もしくは蛍光強度変化による定量を用いることができる。しかしながら、あらゆる種類の分析対象物質の測定に用いることができる点、および分析対象物質の同定も可能である点で、HPLC法もしくはELISA法が好ましい。特にUV検出器を装備したHPLC法が操作性やコスト等の点で好ましい。

本発明の1つの態様において、被酸化性基質が脂質である場合、その酸化生成物には、酸化により分子内にペルオキシ結合（ $-O-O-$ ）を有するに至った脂質過酸化物、オキシ結合（ $-O-$ ）を有するに至った脂質酸化物、およびそれらの脱離により形成されるジエン結合を有するに至った脂質があげられる。したがって、被酸化性基質がコレステロールエステルである場合、その酸化生成物には、例えば、コレステロールエステルヒドロペルオキシド、コレステロールエステルヒドロキシド、酸化ステロールエステル、コレステロールエステルアルデヒドなどがあげられ、コレステロールエステルヒドロペルオキシドとコレステロールエステルヒドロキシドとの総量を測定することが好ましい。

被酸化性基質がコレステロールエステルであり、生体内抗酸化成分が $\alpha$ -トコフェロールであり、酸化反応の開始がAAPHで行われ、そして酸化反応が8時間行われる場合に、抗酸化成分の存在下の状態を維持するには、AAPHの濃度を好ましくは8～12mM、最も好ましくは10mMであるようにする。

本発明の別の側面では、上記の方法により評価された生体試料の抗酸化能力に基づいて、対象患者の疾患の診断または病態の予後評価および／または進展予測を行うことができる。対象となる疾患および／または病態としては、酸化ストレスが増悪因子になることが知られている疾患、例えば、白内障、糖尿病、アルツハイマー、癌、動脈硬化症、心肺疾患、高コレステロール血症、慢性炎症性疾患、虚血性疾患などが挙げられ、その中でも特に酸化ストレスの関与が深い疾患、例えば、糖尿病などの慢性内分泌疾患、アルツハイマーなどの脳疾患、慢性閉塞性肺疾患（COPD）のような肺疾患、非アルコール性脂肪肝にともなう肝疾患（NASH）のような肝疾患、慢性腎不全のような腎疾患、動脈硬化症のような

循環器疾患、クローン病、リウマチのような慢性炎症性疾患、および癌、を挙げることができる。また、本評価を健康診断の1つの指標とすることも可能である。

本発明の更なる側面は、抗酸化成分と被酸化性基質とを含有する生体試料中に抗酸化性被検成分を加えて、酸化反応を開始させ、その抗酸化成分が酸化種によって消費し尽くされない状態でその酸化反応を継続させ、そしてこの酸化反応により酸化された被酸化性基質を定量することを含んでなる、抗酸化性被検成分の抗酸化能力を評価する方法である。

この方法は、抗酸化性被検成分を、抗酸化成分の存在下で起こる生体試料中の被酸化性基質の酸化反応のメカニズムの下に置くことにより、その環境下での抗酸化性被検成分の抗酸化能力を評価しようとするものである。評価の対象は生体試料ではなく、抗酸化性被検成分の抗酸化能力である。この方法によれば、生体内抗酸化成分が存在する状態でも進行する酸化反応に対する、抗酸化性被検成分の抗酸化能力を評価することができる。生体試料、生体試料中に含まれる被酸化性基質、生体試料中に生来的に含有されても添加されてもよい抗酸化物質、酸化反応を開始および継続させる手段、および被酸化性基質からの酸化生成物の定量などは上記の通りである。しかし、生体試料は検査材料の1つに過ぎないから、その組成や抗酸化能力に変動がないのが好ましい。典型的には、予め標準的な生体試料が調製されるのがよい。評価に際して、生体試料は、抗酸化性被検成分と混合されるほか、抗酸化性被検成分との比較のためにコントロールとして使用されてもよく、また、その抗酸化能力が固定値として使用されてもよい。抗酸化性被検成分には、抗酸化性を有することが期待される合成されたかまたは天然の化合物が含まれる。これらは、今後その抗酸化性が期待される化合物であるから、その構造や由来を予め特定することはできない。しかしながら、合成された化合物には、例えば、4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン（以下、BO-653という）が含まれる。抗酸化性被検成分の、生体試料中に含有される抗酸化成分に対するモル濃度の比率は、0.001~1000:1、好ましくは0.002~500:1、より好ましくは0.01~100:1、更に好ましくは0.1~10:1である。

## 実施例

## 実施例 1：血漿試料中のコレステロールエステルの酸化生成物の定量再現性

正常人の血漿試料中のコレステロールエステルを被酸化性基質ととらえてその酸化生成物の定量再現性をみた。

- 5     インフォームドコンセントを得た一人の正常人からヘパリン採血を行ってプール血漿を調製した。

このプール血漿を 1.1 mL ずつ 9 本の試験管に分注して  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。

- 凍結された血漿試料を含有する 3 本の試験管 A、B および C を  $37^{\circ}\text{C}$  に 5 分間  
10   保温することにより内容物を解凍した。解凍後それら試験管を氷中に維持した。

それぞれの試験管から取り出した  $300\mu\text{L}$  の血漿に  $10\mu\text{L}$  の AAPH (和光純薬 (株) 製、Lot No. DWF 1183) 水溶液を AAPH の濃度が  $10\text{mM}$  になるように加えた。次いで、 $37^{\circ}\text{C}$  に保温することで酸化反応を開始させた。

- 酸化反応開始後  $37^{\circ}\text{C}$  で 8 時間してからそれぞれの反応液の入った 3 つの容器  
15   を氷中に浸けることにより反応を停止させた。それぞれ  $100\mu\text{L}$  の反応液に 1 mL の  $0.02\%$  酢酸を含むメタノール溶液と 5 mL のヘキサンを加えて反応液中の脂質を抽出した。そのヘキサン抽出液 4 mL を Speed Vac (ThermoSavant 社製、AES 1010) で濃縮し、それぞれの濃縮物を  $200\mu\text{L}$  のイソプロピルアルコール中に溶解させた。

- 20   C18 逆相カラムを用いる下記条件の HPLC により脂質を溶離させた。234 nm の UV 光で検出を行った。

HPLC 条件：

カラム： C18 逆相カラム (250 x 4.6mm, Supelco 社製、LC-18)

移動相： エタノール：メタノール：イソプロパノール：水＝

25                   2950：900：150：15

流速：  $1.0\text{mL}/\text{min}$

温度： 室温

検出： UV 検出器 (234nm、Agilent 1100 UV variable wavelength detector、G1314A)

外部標準：コレステロールリノリエートヒドロペルオキシド

このHPLC条件では、コレステロールエステルヒドロペルオキシド（CEO  
OH）とコレステロールエステルヒドロキシド（CEOH）の両分子種を含んだ  
コレステロールエステル酸化生成物が約9分の保持時間で溶離され、 $\alpha$ -トコフ  
5 エロールが約5分で溶離された。 $\alpha$ -トコフェロールが存在したことで、この試  
験では $\alpha$ -トコフェロールが存在している状態で酸化反応が進行しかつ停止され  
たことが確認できた。この測定における代表的なHPLCチャートを図1に示す。

同じ測定操作を残る6本の試験管に含有される血漿試料についても行った。  
なお、それらのうち3本を用いた測定は上記測定日の翌日（第2日）に行い、残  
10 る3本を用いた測定は翌々日（第3日）に行った。結果を表1に示す。

表1 CEOOHとCEOHの定量再現性

測定日	試料	CEOOH + CEOH ( $\mu$ M)	日内平均値 ±標準偏差 ( $\mu$ M)	日内変動幅 (C V %)	日間平均値 ±標準偏差 ( $\mu$ M)	日間変動幅 (C V %)
第1日	A	56.48	55.87 ±8.30	14.86	58.59 ±9.24	15.78
	B	47.28				
	C	63.85				
第2日	A	52.68	51.02 ±9.76	19.13		
	B	59.84				
	C	40.53				
第3日	A	73.09	68.89 ±6.03	8.75		
	B	61.98				
	C	71.60				

表1において、日内変動幅とは、同日に測定した試料A、BおよびCの日内平  
15 均値に対する標準偏差のパーセンテージであり、日間変動幅とは、第1～3日の  
日間平均値に対する標準偏差のパーセンテージである。

表1から明らかなように、日内および日間変動幅（CV%）がいずれも20%  
以内である。また、9試料の全体の変動幅は18.2%である。この程度の変動  
幅は、コレステロールエステルの酸化生成物が再現性良く測定できることを示し  
20 ている。



## 実施例 2 : 抗酸化成分が存在する状態の AAPH 濃度への依存性

血漿試料中での AAPH の濃度を 0 ~ 48 mM で変動させた以外は実施例 1 と同様な測定を行うことにより、本発明の測定法において抗酸化成分が存在する状態を維持することの AAPH 濃度への依存性を検討した。結果を図 2 に示す。

5 図 2 から、AAPH 濃度が 5 mM 以上であれば  $\text{CEOOH}$  と  $\text{CEOH}$  の酸化が進行することが分かる。一方、AAPH 濃度が 29 mM 以上になると、抗酸化成分である  $\alpha$ -トコフェロールが存在しなくなることが HPLC により確認された。 $\alpha$ -トコフェロールが消失した酸化反応液の代表的な HPLC チャートを図 3 に示す。

10 したがって、 $\alpha$ -トコフェロールが存在する状態でコレステロールエステルの酸化反応を進行させるには、AAPH を酸化開始剤にした場合には、その濃度を 5 ~ 30 mM 程度にする必要があることが明らかとなった。

## 実施例 3 : $\alpha$ -トコフェロールの脂質酸化促進作用の確認

15 実施例 1 の血漿試料に、AAPH の添加 5 分前に抗酸化物質である  $\alpha$ -トコフェロール、プロブコールまたは 4,6-ジ-*t*-ブチル-5-ヒドロキシ-2,2-ジ-*n*-ペンチル-2,3-ジヒドロベンゾフラン (BO-653) を種々の濃度になるように添加した以外は実施例 1 と同様な測定を行うことにより、試料中に存在する抗酸化物質の種類によって  $\text{CEOOH}$  と  $\text{CEOH}$  の生成量がどのように変化するかを調べた。なお、BO-653 は、WO 94/08930 号公報、  
20 米国特許第 5,574,178 号公報、ヨーロッパ特許出願公開第 0665208 号公報記載の方法により製造することができる。

プロブコール (SIGMA 社製、Lot No. 61K1121) および BO-653 (中外製薬株式会社製、Lot No. 009002) のリノール酸ペルオキシラジカルとの反応速度  
25 は、 $\alpha$ -トコフェロール (ACROS Organics 社製、Lot No. A015821301) についての速度を 1 とした場合、それぞれ 1/17.5 および 1/2 と報告されている (Gotoh N, Shimizu K, Komuro E, Tsuchiya J, Noguchi N, Niki E. Antioxidant activities of probucol against lipid peroxidations. Biochim Biophys Acta. 1992 1128:147-54 ;  
Noguchi N, Iwaki Y, Takahashi M, Komuro E, Kato Y, Tamura K, Cynshi O, Kodama T,

Niki E. 2,3-Dihydro-5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-tert-butylbenzofuran: design and evaluation as a novel radical-scavenging antioxidant against lipid peroxidation. Arch Biochem Biophys. 1997 342:236-43)。リノール酸ペルオキシラジカルとの反応速度を調べる方法は従来の抗酸化能力の評価方法なので、 $\alpha$ -トコフェロール、プロブコールおよびBO-653はいずれも従来の評価方法では抗酸化能力を有するとされた物質である。

結果を図4に示す。なお、図4に示された抗酸化物質の濃度は血漿試料中に外部から加えたものの濃度だけを表示してある。現実には、全ての血漿試料に生来的な $\alpha$ -トコフェロールが存在する。したがって、 $\alpha$ -トコフェロールを外部から加えた試料の $\alpha$ -トコフェロール濃度は表示された値より大きい。

図4から、 $\alpha$ -トコフェロールでは、その濃度の上昇とともに $CEOOH$ と $CEOH$ の生成量が有意に上昇するが、BO-653では、その濃度の上昇とともに $CEOOH$ と $CEOH$ の生成量が有意に低下している。これは、 $\alpha$ -トコフェロールは、従来の抗酸化能力の評価方法でBO-653よりも大きな抗酸化能力があるとされているのに、コレステロールエステルのような脂質の酸化については、むしろそれを促進することを示している。

この結果は、生体試料中の $\alpha$ -トコフェロールに代表される生体内抗酸化成分の総量を抗酸化能力として評価してきた従来の方法では、酸化ストレスによって増悪する病変の真のリスク評価ができていなかったことを示すとともに、生体内抗酸化成分の存在下でも起こる酸化を捉えられる本発明の測定方法が、そのようなリスク評価を的確に行えることを示している。

#### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、 $\alpha$ -トコフェロールなどの抗酸化成分が存在する状態で起こる酸化反応に対する生体の抗酸化能力を評価することができる。特に、酸化ストレスによって増悪する病態においては、抗酸化成分である $\alpha$ -トコフェロールが存在する状態で起こる酸化反応が重要であると考えられることから、本発明は臨床検査法として有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 生体試料の抗酸化能力を評価する方法であって：
  - (a) 少なくとも被酸化性基質を含有する試料を生体から取り出す段階；
  - 5 (b) 前記被酸化性基質の酸化反応を開始させる段階；
  - (c) 前記酸化反応を継続する段階；および
  - (d) 前記酸化反応の進行中にその速度を測定することにより、または前記酸化反応を停止させた後の測定により、前記被酸化性基質からの酸化生成物を定量する段階
- 10 (e) を含んでなり、前記段階 (b) および (c) が1種またはそれを越える抗酸化成分の存在下で行われる方法。
  2. 前記生体試料が、血液、血漿または血清である、請求項1記載の方法。
  3. 前記1種の抗酸化成分が $\alpha$ -トコフェロールである、請求項1記載の方法。
  4. 前記酸化反応の開始が酸化開始剤によって行われる、請求項1記載の方法。
  - 15 5. 前記酸化反応の開始時における前記酸化開始剤の濃度によって前記抗酸化成分が前記酸化反応の間存在し続けることができるように調節される、請求項4記載の方法。
  6. 前記酸化開始剤が2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ヒドロクロリドである、請求項4記載の方法。
  - 20 7. 前記酸化開始剤が2,2'-アゾビス(2-アミジノプロパン)ヒドロクロリドであり、前記濃度が5～30mMである、請求項5記載の方法。
  8. 前記被酸化性基質が脂質であり、前記脂質からの酸化生成物が脂質酸化物と脂質過酸化物とを含む、請求項1記載の方法。
  9. 前記脂質がコレステロールエステルであり、前記脂質酸化物がコレステロールエステルヒドロキシドであり、そして前記脂質過酸化物がコレステロールエステルヒドロペルオキシドである、請求項8記載の方法。
  - 25 10. 前記被酸化性基質からの酸化生成物の定量が前記酸化反応の停止後の測定により行われる、請求項1記載の方法。

1 1. 前記被酸化性基質からの酸化生成物の定量が、その定量を可能にする分析対象物質のHPLCによる溶離を含んでなる、請求項1記載の方法。

1 2. 前記分析対象物質がUV光により検出される、請求項11記載の方法。

5 1 3. 前記生体試料が、前記段階(b)および(c)を抗酸化成分の存在下で行うのに十分な量の抗酸化成分を含んでいない場合に、前記段階(b)を行う前に、前記生体試料に抗酸化物質を添加する段階を更に含んでなる、請求項1記載の方法。

1 4. 前記生体試料に添加される前記抗酸化物質が、前記生体試料に生来的に含有される抗酸化成分のうちの1種である、請求項13記載の方法。

10 1 5. 請求項1記載の方法により評価された生体試料の抗酸化能力に基づいて、対象患者の疾患の診断または病態の予後評価および／または進展予測を行う方法。

1 6. 前記疾患が、慢性内分泌疾患、脳疾患、肺疾患、肝疾患、腎疾患、循環器疾患、慢性炎症性疾患または癌である、請求項15記載の方法。

1 7. 抗酸化性被検成分の抗酸化能力を評価する方法であって：

15 (a) 少なくとも被酸化性基質を含有する試料を生体から取り出す段階；

(b) 前記生体試料に前記抗酸化性被検成分を添加する段階；

(c) 段階(b)の混合物の酸化反応を開始させる段階；

(d) 前記酸化反応を継続する段階；および

20 (e) 前記酸化反応の進行中にその速度を測定することにより、または前記酸化反応を停止させた後の測定により、前記被酸化性基質からの酸化生成物を定量する段階

を含んでなり、前記段階(c)および(d)が1種またはそれを越える抗酸化成分の存在下で行われる方法。

25 1 8. 前記生体試料が、前記段階(c)および(d)を抗酸化成分の存在下で行うのに十分な量の抗酸化成分を含んでいない場合に、前記段階(c)を行う前に、抗酸化物質を添加する段階を更に含んでなる、請求項17記載の方法。

=====  
Injection Date : 4/3/2002 1:05:46 PM Seq. Line : 4  
Sample Name : 7.5A Location : Vial 4  
Acq. Operator : OC Inj : 1  
Inj Volume : 20  $\mu$ l  
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\OC020403.S  
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\PLOXSMPL.M  
Last changed : 3/8/2002 7:20:38 PM by SR  
PLOX Sample Method with PLOX Mobile Phase from bottle B, run time 25 min , Inj. vol is 20  $\mu$ L  
VWD1 A, Wavelength=234 nm (OC020403\004-0401.D)

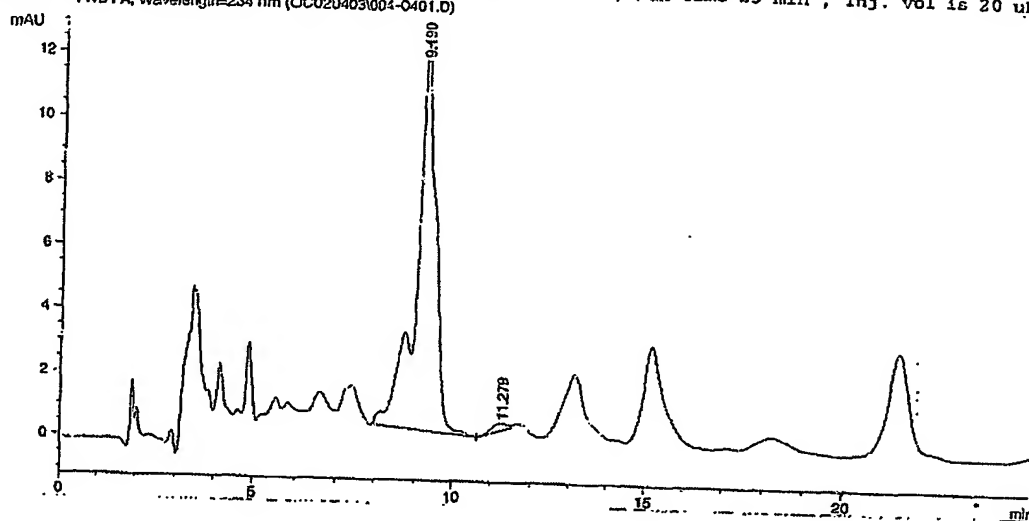


図 1

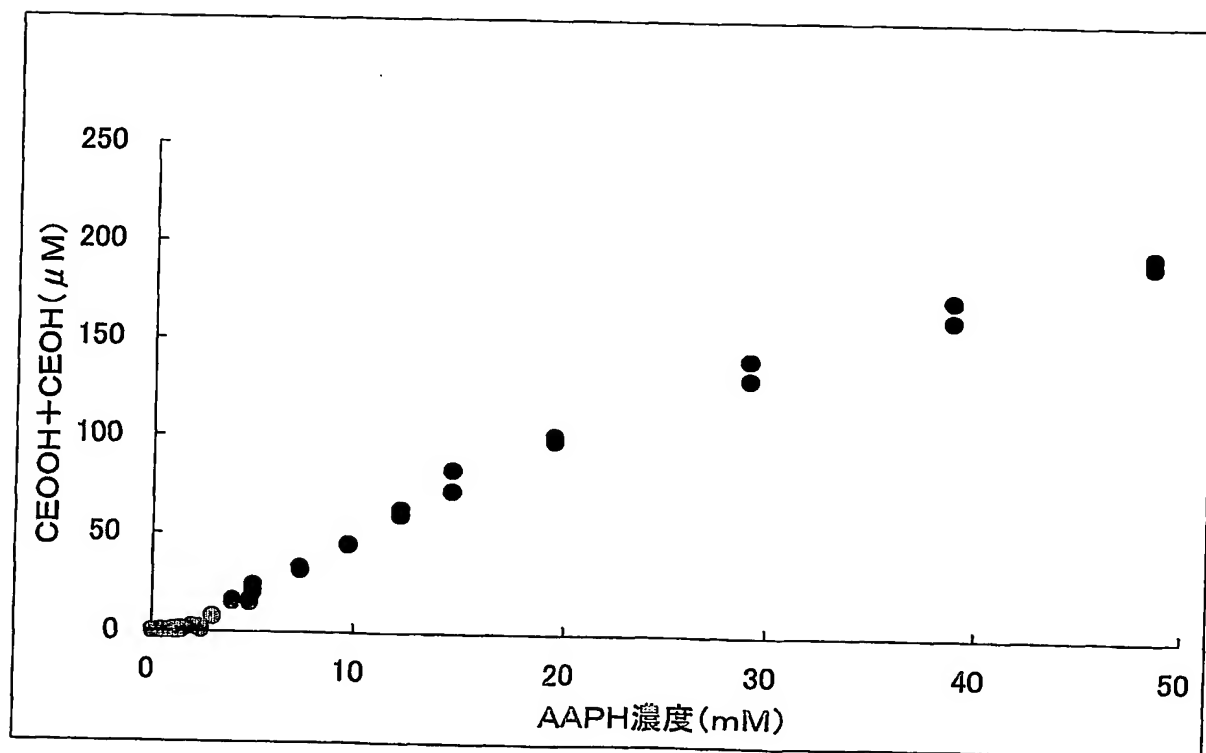


図 2

```

=====
Injection Date : 4/3/2002 3:44:48 PM      Seq. Line : 10
Sample Name   : 40A                      Location  : Vial 10
Acq. Operator : OC                       Inj       : 1
                                           Inj Volume: 20 µl
Sequence File : C:\HPCHEM\1\SEQUENCE\OC020403.S
Method        : C:\HPCHEM\1\METHODS\PLOXSAMPL.M
Last changed  : 3/8/2002 7:20:38 PM by SR
PLOX Sample Method with PLOX Mobile Phase from bottle B, run time 25 min , Inj. vol is 20 µL
VWD1 A, Wavelength=224 nm (OC020403010-1001.D)

```

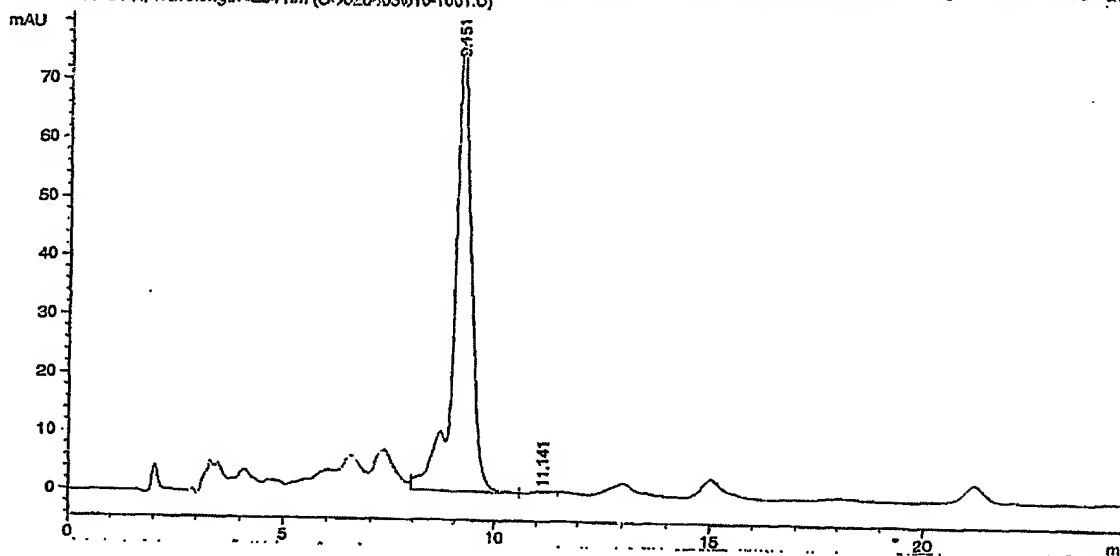


図 3

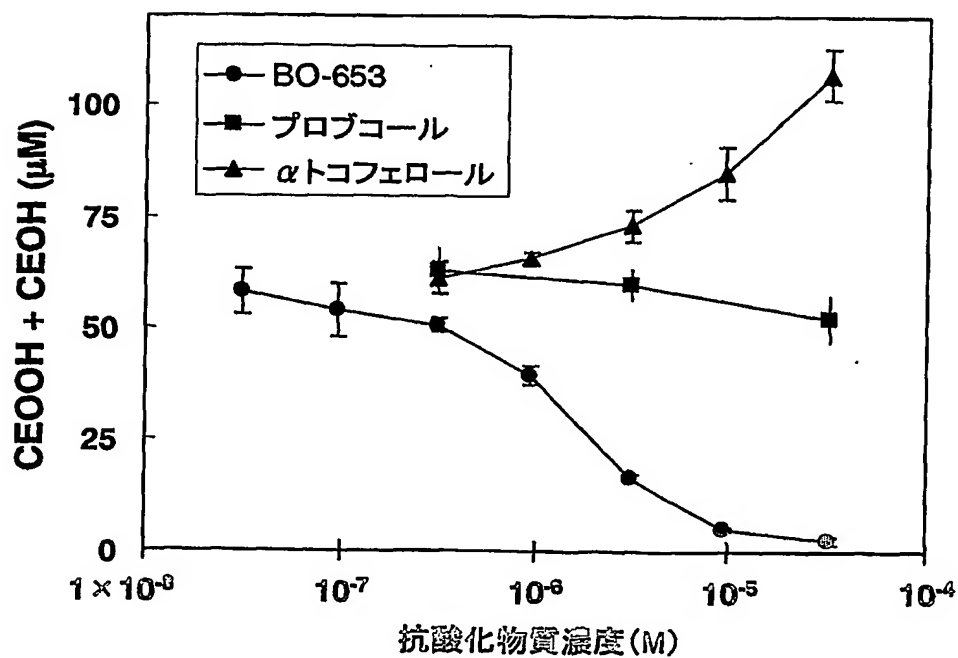


図 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003873

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N33/92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WAYNER et al., "Quantitive measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation", FEBS LETTERS, Vol.187, No.1(1985), pages 33 to 37	1-18
Y	KRITHARIDES et al., "A method for defining the stages of LDL oxydation", Analytical Biochemistry, Vol.213(1993), pages 79 to 89	1-18
Y	JP 10-282001 A (Tohoku Electronic Industrial Co., Ltd.), 23 October, 1998 (23.10.98), & EP 0869361 A & US 6156577 A	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 April, 2004 (09.04.04)

Date of mailing of the international search report  
27 April, 2004 (27.04.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/003873

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-083977 A (Mitsubishi-Tokyo Pharmaceuticals, Inc.), 19 March, 2003 (19.03.03), (Family: none)	1-18
P, Y	JP 2003-270243 A (Ajinomoto Co., Inc.), 25 September, 2003 (25.09.03), (Family: none)	1-18



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/92

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. G01N33/92

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2004年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2004年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WAYNER et al "Quantitive measurement of the total, peroxy radical -trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation" FEBS LETTERS, vol.187, no.1 (1985) p33-37	1-18
Y	KRITHARIDES et al, "A method for defining the stages of LDL oxydation" Analytical Biochemistry, vol.213 (1993) p79-89	1-18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.04.2004

国際調査報告の発送日

27.4.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 10-282001 A(東北電子産業株式会社) 1998. 10. 23 & EP 0869361 A & US 6156577 A	1-18
Y	JP 2003-083977 A(三菱東京製薬株式会社) 2003. 03. 19 (ファミリーなし)	1-18
PY	JP 2003-270243 A(味の素株式会社) 2003. 09. 25 (ファミリーなし)	1-18